

马铃薯原生质体制备及转化试剂盒使用说明 (2021 第 1 版)

产品编号: PPT161-5T (由 A 盒和 B 盒组成)

储存条件: -20°C 储存, 保质期一年

产品组成:

组分编号	组分名称	5 T	10 T
PPT161-1	溶液 I	80 mL	80 mL×2
PPT161-2	Cellulase R10	0.75g	1.5g
PPT161-3	Macerozyme R10	0.175g	0.35g
PPT161-4	BSA (10%)	2.5 mL	5 mL
PPT161-5	AMP (100 mg/mL)	1 mL	1 mL
PPT161-6	溶液 FM	110 mL	110 mL×2
PPT161-7	溶液 CM	110 mL	110 mL×2
PPT161-8	溶液 MP	30 mL	60 mL
PPT161-9	溶液 MR	30 mL	60 mL
PPT161-10	溶液 MPS	100 mL	100 mL×2
PPT161-11	培养基 E	100 mL	100 mL×2
PPT161-12	溶液 MMg	10 mL	10 mL×2
PPT161-13	溶液 PEG	5 mL	10 mL
PPT161-14	溶液 W5	30 mL	60 mL
PPT161-15	还原剂 (β -me)	100 μ L	200 μ L
PPT161-16	细胞筛	5 片	10 片
说明书	一份		

产品简介:

本试剂盒主要通过纤维素酶和离析酶配制的酶解液消化植物细胞壁获得原生质体。适用于从生长 3 周（21 天）的试管苗中分离原生质体。获得的细胞可用于蛋白的亚细胞定位，验证蛋白间的相互作用，研究蛋白的转录调控等。本试剂盒包含原生质体制备和转化需要的全部试剂，按照每次 20 mL 酶解液的使用量，可供 5 次实验。

使用说明:

一、准备工作

1. 需要准备的材料（本试剂盒不提供）:

锋利刀片；血球计数板；50 mL 离心管；2 mL 离心管

2. 即用型酶解液配制

配制顺序	组分	20 mL 体积	40 mL 体积
第一步	溶液 I	8 mL	16 mL
	Cellulose R10	0.15g	0.3g
	Macerozyme R10	0.035 g	0.07 g
第二步	混匀后 55°C 水浴 10min，期间颠倒混匀 2-3 次，冷却室温后加入以下成分		
第三步	BSA (10%)	100 μ L	200 μ L
	β -巯基乙醇	3.57 μ L	7.14 μ L
	Amp	5 μ L	10 μ L
第四步	加去离子水定容		
第五步	过滤除菌		

二、原生质体的分离制备

1. 选生长三周状态良好的试管苗，取其完全展开的叶片进行预处理。将叶片放入溶液 FM 中 20°C 黑暗 48h，然后转入溶液 CM 中 4°C 培养 24h。
2. 在超净工作台中用灭菌刀片将叶片横向（平行主叶脉）切成 0.5-1.0 mm（实际宽度）的细条（去掉主叶脉），置于含有 20 mL 混好的酶解液中（培养皿），避光室温 40 rpm 摇床摇动约 6-9 h，直至大部分叶片长条呈现透明，说明基本酶解完毕。

注：以上酶解时间针对于四倍体马铃薯，二倍体的样品酶解时间一般在 12-18 h。

3. 收集原生质体前，80 rpm 摇床摇动 1-5 分钟，让原生质体彻底释放出来（可以每隔 5 分钟用手轻轻晃动 3-5 次）。

4. 酶解后的产物用细胞筛过滤，用镊子或无菌枪头轻轻夹取酶解物帮助充分释放原生质体，去除未消化的叶片组织将所得的液体收到 50 mL 离心管中。

注：由于原生质体在制备过程中极易破碎，操作过程中应尽可能动作要轻柔，避免剧烈震荡，防止原生质体破碎。

5. 选用水平转头，800rpm 离心 8 min，去除上清。

注：离心时，可调低离心机的升速和降速。升速过快，原生质体可能离到管壁上；降速过快，可能导致管底原生质体悬起。建议升速和降速分别都使用 3。

6. 取 5mL 预冷的溶液 MP 加入 10-50mL 离心管中备用。

7. 用 5mL 预冷的溶液 MR 轻柔重悬位于底部的原生质体，用剪尖的蓝枪头轻轻将原生质体悬起加入上步所得 5mL 的溶液 MP 上。

8. 选用水平转头，600rpm 离心 8 min，收集位于两界面处的中间环带。

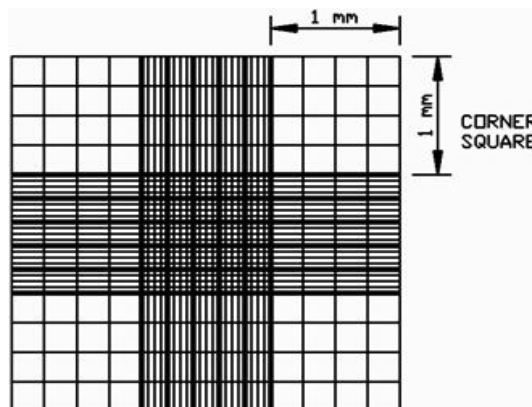
9. 用 5mL 溶液 MPS 轻柔洗涤沉淀，500rpm 离心 5 min，去除上清（重复两次）。

10. 用适量培养基 E 将沉淀重悬，取适量进行镜检。

注：如原生质体呈现圆球形，叶绿体分散在整个细胞内，说明状态较好；如呈现不规则形状，说明原生质体破碎或即将破碎。

血球计数板的使用：

如下图所示，在血球计数板上加上一个盖玻片，分别从两侧凹槽加入样品。使用中央区域长和宽都是 1 mm 的方形区域进行计数（25 个中方格）。分别统计正方形四个顶角和中央的小正方形的细胞数量，取平均值再乘以 25（正方形被分成了 25 个小正方形），计算该区域的细胞数量，该区域的体积为 0.1 μ l（长 1 mm，宽 1 mm，高 0.1 mm）。计算获得的细胞数量。原生质体密度（个/mL）=25 个中方格原生质体数 $\times 10^4 \times$ 稀释倍数。



11. 500rpm 离心 5 min，升速 3，降速 3，去上清，用相应体积的溶液 MMg 重悬原生质体，调整原生质体密度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 。（如细胞量较少，可以将所有细胞用于 1-2 个转化体系）

三、原生质体的转化

1. 在 2 mL 的圆底离心管中加入 10 μL (10-20 μg) 纯化后的质粒，随后加入 100 μL 原生质体，轻轻混匀，再加入 110 μL 溶液 PEG，轻轻旋转离心管，或使用剪尖蓝枪头（1ml 吸头）轻轻吸打，直至混匀，此过程中避免产生气泡，室温放置 3-30 min（常用 15min）。

2. 加入 0.44 mL 溶液 W5，轻柔混匀，终止转化。500rpm 离心 5 min，升速 3，降速 3，在不损失原生质体的情况下，尽可能去除上清。

四、原生质体的培养和收集：

1. 加入 2 mL 培养基 E 悬浮细胞，密度调整为 5×10^4 个/mL，转移于直径 60mm 皿中封口浅层静置黑暗培养。

2. 24°C 条件下培养原生质体 3 天。

3. 之后，逐渐增加光照，培养过程中每隔 2-3 天适当添加新鲜的培养基 E。

4. 后续培养请参照相关文献进行。

注意事项：

1. 分离制备的原生质体没有细胞壁的保护，非常脆弱，整个实验操作过程中动作尽可能的轻柔。

2. 为了避免原生质体离心时贴在管壁，建议整个实验过程使用平角转头。

3. 实验过程中尽可能使用剪尖蓝枪头（1ml 吸头），因为其尖端的孔径较大；或把黄色枪头的尖端剪掉，并保证平滑。